

**Wirkungen einer Desoxyribonuklease auf das
Wachstum von Hefezellen, Bestimmung von Zellgröße
und Zellvermehrung mit und ohne Desoxyribonuklease
und in Gegenwart von oberflächenaktiven Substanzen**

Gabriele Mey

Frankfurt a/M.
1963

Aus dem Institut für vegetative Physiologie der

Universität Frankfurt am Main

(Direktor Professor Dr. E. Heinz)

Wirkungen einer Desoxyribonuklease auf das Wachstum von
Hefezellen, Bestimmung von Zellgröße und Zellvermehrung
mit und ohne Desoxyribonuklease und in Gegenwart von
oberflächenaktiven Substanzen.

Inauguraldissertation zur
Erlangung der Doktorwürde
in der gesamten Medizin
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Johann Wolfgang Goethe Universität
zu Frankfurt am Main

vorgelegt von

Gabriele Mey

aus Kassel

Frankfurt am Main 1962

Dekan: Prof. Dr. Krücke
Referent: Prof. Dr. Zahn
Korreferent: Prof. Dr. Wacker

mündliche Prüfung: 14. 1. 1963



Inhaltsverzeichnis

=====

Vorwort

- I. Einführung in die DNase - Forschung
- II. Versuchsmethoden
- III. Modifizierung der Desoxyribonuklease-Wirkung durch
oberflächenaktive Substanzen
 - Einführung
 - Methoden
 - Ergebnisse
- IV. Wirkung der Desoxyribonuklease I auf Wachstum
und Vermehrung von Hefezellen.
- V. Diskussion

Zusammenfassung

Lebenslauf

Vorwort

In der vorliegenden Arbeit soll in Weiterführung der Versuche von Ochs (32) und Tuschy (40) über die Wirkung von Desoxyribonuklease I (Worthington) auf *Saccharomyces cerevisiae* Klärung folgender Fragen gesucht werden:

Beeinflusst die Desoxyribonuklease I (Worthington) Zellwachstum und Zellvermehrung von *Saccharomyces cerevisiae*?

Kann die Wirkung des Desoxyribonuklease I auf *Saccharomyces cerevisiae* durch oberflächenaktive Substanzen geändert werden?

Es ist mir ein Anliegen, an dieser Stelle Herrn Professor Dr. R. K. Zahn für die Überlassung des Themas sowie für seinen freundlichen Rat und Beistand bei der Planung und Interpretation der Versuche zu danken.

Frau Annesuse Hagedorn, Fräulein Marianne Zirker und Herrn Dr. Gerhard Tuschy danke ich für ihre Hilfe bei der Durchführung der Versuche.

Schließlich möchte ich der Deutschen Forschungsgemeinschaft meinen Dank für die materielle Unterstützung dieser Arbeit aussprechen.

Einführung

Seit der Erforschung der DNS hat man sich immer wieder mit der Frage beschäftigt, welche Rolle die Desoxyribonukleasen (DNasen) in der DNS-Synthese spielen.

DNasen kommen nach Untersuchungen von Allfrey und Mirskey (1), sowie von Brody und Thorell (5) in fast allen Geweben vor. Regenerierende Gewebe sind DNase-reicher: Milz und Knochenmark z. B. enthalten viel DNase, dagegen Herz und Hirn wenig oder gar keine. Foetales Pancreasgewebe (1) weist zwei- bis dreimal mehr DNase auf als jungendliches, hingegen liegt der Gehalt der Darmmucosa niedriger als in jungendlicher.

Brody (6) untersuchte die DNase-Aktivität im Zusammenhang mit der DNS-Synthese in normaler, regenerierender, preecanceröser und canceröser Rattenleber. Er fand, daß in normalem Gewebe eine Zunahme der Wachstumsrate verbunden ist mit einem Anstieg der DNase-Aktivitäten in den Zellen. 12 Stunden nach partieller Hepatektomie konnte bereits eine DNase-Erhöhung festgestellt werden. Jedoch lag die DNase-Konzentration in Tumorgeweben bei steigender DNS-Synthese niedriger als in normalem Gewebe. Dieses widersprüchliche Phänomen kann durch die Befunde von Goldacre und Sylven (13) und Malmgreen und Sylven (23) erklärt werden, welche zeigen, daß nur die Randzonen maligner Tumoren lebhaftes Wachstum und damit hohe DNase-Aktivitäten aufweisen, während die inneren Partien wegen ihrer schlechteren Durchblutung nekrotisch werden. Die DNase-Bestimmung der Randzonen allein müßte also auch höhere Werte ergeben.

Kunkee und Pardee (19) fanden, daß das Angehen einer Bacteriophageninfektion abhängig ist von der Anwesenheit aktivierter DNase. Ohne diese wird keine DNS gebildet.

Die aus diesen Befunden abgeleitete Hypothese, es handele sich bei der DNase um ein an der Mitose, d.h. der DNS-Synthese, beteiligtes Ferment, wird durch mehrere andere Beobachtungen un-

terstützt. In Anwesenheit physiologischer Mengen DNase I (10^{-6} g/ml) kann die Teilungszeit befruchteter Seeigelleier (44, 45, 46), Amphibieneier (47) herabgesetzt, sowie die Vermehrung von Einzellern (47, 48) beschleunigt werden. Die mitosefördernde Wirkung von Östradiol-17-beta wird durch DNase I verstärkt (32). Vermutlich handelt es sich auch bei den von Letirè und Thom (21), Paschkis (34) und Friedrich-Frekxa und Zaki (12) gefundenen mitosefördernden Substanzen aus Homogenisaten von Zelltrümmern, bzw. Organextrakten von Leberregeneraten um DBase-haltiges Material.

In scheinbarem Widerspruch dazu stehen folgende Untersuchungsergebnisse. Chévremont (10) beobachtete nach DNase-Zusatz eine Entwicklungshemmung von Zellkulturen. Nach Arbeiten von Garilhe und Laskowski (35) baut DNase I DNS in vitro zu durchschnittlich Tetranukleotiden ab. Kowlessar und Altmann (18) konnten nachweisen, daß Ratten 18 Stunden nach totaler Körperbestrahlung zweimal mehr DNase ausscheiden. Nach 6 Tagen hatte sich die Menge sogar vervierfacht. Daß es sich hier um eine depolymerisierende Wirkung der DNase an standortfremder DNS handelt, die aus den zerstörten Körperzellen frei wird, konnte durch Versuche von Zahn, Docter und Heicke (43) nachgewiesen werden: Injektionen von DNS in Mäuseohr, bzw. Rattenperitoneum führen zu hochsignifikantem DNase-Anstieg im Blut.

Ausgehend von diesen Ergebnissen wurden daher die DNasen als Depolymerasen angesehen (25). Die Beschleunigung der Zellteilung, als auch die Erhöhung der DNase-Aktivität in regenerierendem Gewebe lassen sich allerdings durch diesen Mechanismus nicht erklären. Vielmehr muß der Hauptangriffspunkt des Ferments in der DNS-Synthese gesucht werden (Kornberg 17, Lehmann 20, Bollum 4). Wie aus den Arbeiten von Watson-Crick (41) hervorgeht, führt der Weg zur DNS-Vermehrung von der doppelsträngigen nativen DNS über eine Entdrillung der Doppelhelix zur Ausbildung zweier neuer zweisträngiger Moleküle, wobei der Einzelfaden den Nukleotiden Adenin und Thymin, Guanin

und Cytosin gegenüber die Funktion einer orientierenden Matrize hat. Die Rolle der DNase in diesem Vorgang scheint in der Denaturierung der elterlichen DNS, d.h. in der Entdrillung der Doppelhelix zu liegen, die erst der Desoxyribonukleotid-Polymerase den Angriffspunkt ermöglicht (17).

Die oben zitierten Ergebnisse von Chévrement, Garilhe und Laskowski, Kowlessar und Altmann widersprechen unserer Meinung nach nicht einer hypothetischen Funktion der DNase I in der DNS-Synthese, weil sie 1. in unphysiologisch hohen Dosen (10), 2. in vitro (35) und 3. an standortfremder DNS (18) ausgeführt wurden. Im biologischen Experiment bei physiologischen Konzentrationen hat sich die DNase bisher immer als ein wachstumsförderndes Ferment erwiesen.

Ochs (32) und Tuschy (40) haben aus ihren Versuchen anhand von Trübungsmessung und Sedimentvolumenbestimmung auf einen Wachstums- bzw. mitosefördernden Effekt der DNase auf Hefezellen geschlossen. Wir haben uns nun folgendes überlegt:

1. Wenn die DNase intrazellulär wirkt, so muß sie die Plasmamembran durchdringen können. Den indirekten Beweis für das Eindringen der DNase in die Zelle haben wir mit einer auch in der Bakteriologie geübten Methode zu erbringen versucht, nämlich durch Zusatz oberflächenaktiver Substanzen in das Nährmedium. Dabei gingen wir von der Annahme aus, daß die Spannungsverhältnisse an der Zelloberfläche durch Detergentien verändert werden und die DNase daher leichter eindringen könne.

2. Dann schien es uns interessant zu erfahren, auf welche Weise nun die in die Zelle eingedrungene DNase ihre Wirkung entfaltet; Wirkt sie - auf länger Zeit gesehen - nur mitosesteigernd oder auch wachstumsfördernd? Wir haben daher neben Trübungsmessung und Zellsedimentvolumenbestimmung zur Differenzierung der Ergebnisse auch Zellzahl durch Auszählung der Hefezellen in der Leukocytenkammer (Neubauer) und Zellfläche durch Planimetrie bestimmt.

Methoden

1. Material: Es wird die käufliche frische Bäckerhefe verwendet.

2. Nährmedium: Wir hielten die von Ochs (32) entwickelte Salzlösung, die uns übersichtliche Verhältnisse gibt, anstatt der sonst gebräuchlichen Melasse. Penicillin wurde inzugegeben, um ein übermäßiges Bakterienwachstum zu verhindern. Das pH der Lösung liegt bei 4,5, welches für das Hefewachstum der optimale Bereich ist (31). Ochs (32) verzichtete mit Absicht auf eine Verschiebung des pH zum Neutralpunkt, dem Wirkungsoptimum der DNase, da er ohnehin von einer intrazellulären Wirkung des Ferments ausging. PH-Messungen nach Gutstein ergaben Werte von pH 7,2 - 7,6 in der Hefezelle, es herrschen also in der Zelle optimale Bedingungen für die DNase.

Zusammensetzung der Nährlösung:

0,013 Mol KCl

0,009 Mol CaCl_2

0,05 Mol NH_4Cl

0,02 Mol NaH_2PO_4

0,05 Mol MgCl_2

3% Rohrzucker

6×10^{-6} g/ml Penicillin

0,01% Hefe

3. Versuchsanordnung: Die 0,01%ige Hefelösung wird nach Zusatz des zu testenden Stoffes in je 12 Reagensgläser pro Ansatz gefüllt. Zu jedem Versuch ließen wir eine Kontrolle (0-Ansatz) laufen. Die Gläser wurden mit Parafilm verschlossen und bei 37°C in den Brutschrank gestellt. Um die Bevorzugung einer Charge zu vermeiden, stellten wir die Gläser jeweils so, daß neben jedem 0-Ansatz ein F-Ansatz (Ferment-Ansatz) stand, also in der Reihenfolge: 0, F, F, 0, 0, F, F, ... In der Regel ließen wir den Versuch 48 Stunden laufen, bei einer Zwischenmessung nach 24 Stunden.

4. Meßmethoden: Zur Messung des Hefewachstums wurden 4 Methoden vorgenommen.

a) Trübungsmessung im Photometer Eppendorf. Diese Methode setzt voraus, daß alle Zellen gleich groß sind und gleiche

optische Eigenschaften besitzen, dann würde die Streuung des einfallenden Lichts proportional der Anzahl der suspendierten Teilchen sein. Obwohl diese Voraussetzung für die Hefe nicht zutreffen, ergibt die Trübungsmessung doch recht genaue Werte. Allerdings hat sich in dieser Arbeit herausgestellt, daß mit dieser Methode ein Unterschied zwischen Zellwachstum und Zellvermehrung nicht darstellen läßt.

b) Zellzählung in der Leukozyten-Zählkammer von Neubauer. Es wurden dafür aus jedem Reagensglas einer jeden Versuchsreihe nach gutem Umschütteln je 2 ml entnommen und in ein Sammelgefäß getan. Durch Zusatz von 5 Tropfen Formalin töteten wir die Zellen ab. Wir füllten die Zählkammer zehnmal auf und machten im ganzen 40 Zählungen, d.h. wir zählten 50 mal 4 Quadrate aus. Da die Verteilung der Zellen in den einzelnen Feldern unterschiedlich ist, zählen wir, um eine subjektive Auswahl zu vermeiden, nur die diagonalen Quadrate.

c) Sedimentvolumenbestimmung in für die Hämatokrit-Bestimmung gebräuchlichen Kafk-Röhrchen. Es wurden aus jedem Reagensglas, ebenfalls unter Zusatz von Formalin, 6 ml entnommen und in Zentrifugengläser gefüllt, jedes dieser Gläser enthielt Proben zweier Reagensgläser, also im ganzen 6 Zentrifugengläser à 12 ml pro Ansatz, die 10 Minuten bei 3000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert wurden. Danach quantitative Ausspülung in Kafka-Röhrchen und wieder Zentrifugieren 10 Minuten lang bei gleicher Umdrehungszahl. Die abgelesenen Werte sind in Hämatokrit-Einheiten angegeben, eine Einheit entspricht $2\mu\text{m}^3$.

d) Photographie und Planimetrie. Von einem Zentrifugat (2min. bei 3000 Umdrehungen) wird eine Probe entnommen und auf einen Objektträger übertragen, darüber ein Deckgläschen gelegt. Unter dem Mikroskop wird eine Stelle herausgesucht, wo möglichst die größte Anzahl der Zellen 1. scharf zu sehen ist, 2. einzeln liegt. Von jedem Ansatz werden 16 Aufnahmen gemacht.

Wir photographieren uns gleichzeitig einen Maßstab.

Die Negative werden mit dem Projektionsapparat an die Wand projiziert und die Umrisse der Zellen auf ein weißes Papier gezeichnet, pro Aufnahme ein Blatt. Wir haben dann mit dem Planimeter alle gezeichneten Zellen umfahren und jedesmal den Wert abgelesen. Es wurde der Mittelwert - die durchschnittliche Zellfläche pro Aufnahme - errechnet, 100 Planimeter-einheiten (PE) entsprechen etwa $19 \times 10^{-6} \text{ cm}^2$.

4. Statistische Sicherung der Ergebnisse. Die Frage, ob die Mittelwerte unserer Ergebnisse sich nur zufällig oder signifikant unterscheiden, beantworteten wir mit dem Student's Test. Alle Ergebnisse, die außerhalb der Schranke von $p = 0,001$ lagen, wurden als nicht signifikant angesehen.

I. Modifizierung der DNase-Wirkung durch
=====

oberflächenaktive Substanzen
=====

Einführung

Gehen wir von der Voraussetzung aus, daß DNase durch Pinocytose aufgenommen wird (siehe Diskussion), so müßte dieser Vorgang durch oberflächenaktive Substanzen beschleunigt und die Fermentwirkung erhöht werden können.

Allgemeines über oberflächenaktive Substanzen (51).

Oberflächenaktive Substanzen enthalten in ihrem Molekül fett- und wasserlösliche Bestandteile. Auf Grund dieser Struktur haben sie die Tendenz, sich an Oberflächen anzureichern, wobei sie die Spannungsverhältnisse verändern. Als oberflächenaktive Substanzen können alle diejenigen Stoffe bezeichnet werden, die in Lösung als benetzende, emulgierende oder detergierende Mittel wirksam sind und die, wenn sie geschüttelt werden, einen stabilen Schaum entwickeln.

Sie lassen sich nach ihren physikalischen Eigenschaften in drei Hauptgruppen einteilen:

1. Anionen

mit einer freien $\begin{matrix} 0 \\ -S=0- \\ 0 \end{matrix}$, Carboxyl- oder Phosphatgruppe.

Zu dieser Klasse gehören Fettsäuren, Seifen, Phenole.

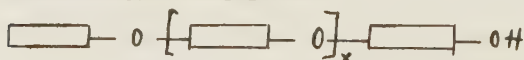
2. Kationen

mit freien N, S, As, P, J-Gruppen.

Zu dieser Klasse gehören oberflächenaktive polypeptidische Antibiotica (Tyrocidin, Gramicidin-S etc.).

3. Nicht-ionisierte

Hier wird die hydrophobe Gruppe von nicht ionisierten hydrophilen Gruppen ausgeglichen.



Dazu gehören Tween 80, ein Polyoxyalkylen-Derivat von Sorbitan-Mono-Oleat, und Triton WR 1339, ein Polyoxyäthylenester. Im Gegensatz zu den ionisierten Substanzen zeigen nicht-ionisierte keine, oder aber nur eine indirekte, bakterizide Wirkung.

Für die bakterizide Wirkung ionisierter oberflächenaktiver Substanzen lassen sich drei Hypothesen aufstellen, von denen die letztere am wahrscheinlichsten sein dürfte (51):

1. Inaktivierung von spezifischen Enzymen in der Zellmembran.
2. Allgemeine Denaturierung von Zellproteinen.
3. Physikalische Desorganisation der Zellmembran.

Für die physikalische Desorganisation der Zellmembran durch ionisierte oberflächenaktive Substanzen spricht, daß die negative Ladung der Zellmembran abnehmen kann bis zur Neutralität. Nach Dyar und Ordell (51) kann sie sich sogar positiv aufladen. Über die Wirkungsweise nicht-ionisierter Substanzen ist noch wenig bekannt.

Versuchsmethoden

Die Detergenskonzentrationen wurden in einer Versünnungsreihe mit aqua bidestillata hergestellt. Die Versuchsanordnung war die gleiche wie oben beschrieben, zu jeder Detergensreihe wurde eine Kontrolle geführt.

Ergebnisse mit Tween 80 (s. Tab. 3)

In Anwesenheit von 5×10^{-6} g/ml DNase I wurden zunächst die Konzentrationen von 10^{-5} bis 10^{-7} ml/ml Tween getestet. Wegen der wenig befriedigenden Ergebnisse versuchten wir niedrigere DNase-Konzentrationen, in der Annahme, daß sich die Tween-Wirkung vielleicht erst bei den DNase-Mengen zeigen werde, wo sonst kein wachstumsfördernder Effekt mehr auftrat. Wir wählten DNase-Konzentrationen von 5, 2, 0,5, 0,3, 0,1, 0,03 $\times 10^{-6}$ g/ml.

Das nicht-ionisierte Tween 80 zeigte wechselnde Wirkung auf das Wachstum von Hefezellen und seine Beschleunigung durch DNase I.

Wir beobachteten in vier von neun Versuchen signifikante Eigeneffekte, wobei nur in einem Versuch (M 2) alle drei Meßmethoden gleichsinnige Veränderungen zeigten. In vier von neun Versuchen ließen sich ein DNase verstärkender Effekt nachweisen, in jedoch nur einem von diesen lag kein gleichzeitiger Eigeneffekt des Tween in den Kontrollen vor (M 4).; Es wurde das Wachstum der Hefezellen unter Zusatz von 5×10^{-6} g/ml DNase I und 10^{-7} ml/ml Tween 80 laut Trübungsmessung und Sedimentvolumenbestimmung im Vergleich zu den Fermentansätzen ohne Tween 80 um 15 % und 9,3 % signifikant gesteigert. Im Versuch M 14 trat bei einer Konzentration von $0,5 \times 10^{-6}$ g/ml DNase I und 10^{-5} , bzw. 10^{-6} ml/ml Tween 80 überraschenderweise eine signifikante Hemmung von 6 %, bzw. 7 % auf, die allerdings nur in der Trübungsmessung und andeutungsweise in der Sedimentvolumenbestimmung zum Ausdruck kam.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die Wirkung des Tween 80 auf die Aufnahme der DNase in die Zelle weder mit Sicherheit bejaht noch verneint werden kann. Wir sind der Meinung gewesen, daß die unterschiedliche Reaktionsweise auf Tween durch ihren mehr oder weniger guten Ernährungszustand zu erklären und demnach durch bessere Kulturbedingungen, etwa im Sinne einer Hefedauerkultur, konstant zu erhalten sein müsse. Auch der oft sehr hohe Eigeneffekt, wenn er als vermehrte Wasseraufnahme verstanden wird, würde für diese Annahme sprechen. Unter dem Eindruck der folgenden Ergebnisse mit ionisierten Detergentien, die unter gleichen Versuchsbedingungen gewonnen wurden, sind wir jedoch zu der Auffassung gelangt, daß Tween 80 seine Wirkung an der Oberfläche der Hefe nicht richtig entfalten kann.

Ergebnisse mit dem Kationen-Detergens Hexadecyl-Trimethyl-Ammonium-Bromid (s. Tab. 4)

Es wurde zunächst in einer Verdünnungsreihe von 10^{-5} bis 10^{-9} ml/ml der Eigeneffekt des Detergens auf die Hefezellen getestet. Es scheint bei Konzentrationen von 10^{-5} und 10^{-6} ml/ml einen toxischen Effekt zu haben, denn es kommt zum Stillstand, bzw.

zur Verlangsamung des Hefewachstums. Bei 10^{-7} bis 10^{-9} ml/ml trat keine Veränderung des Hefewachstums im Vergleich zu den Kontrollen auf, es wurden daher diese Konzentrationen gewählt, um den Einfluß der Substanz auf die DNase-Wirkung zu testen. Versuch M 24 zeigt eine im Vergleich zu den Fermentansätzen hochsignifikante Hemmung des Zellwachstums unter DNase und Hexadecyl-Trimethyl-Ammonium-Bromid bis zu 41 %.

Ergebnisse mit dem Anionen-Detergens Natrium-Tetra-Decyl-Sulfat (s. Tab. 5)

Es wurde wieder eine Verdünnungsreihe angesetzt, wobei sich die von Salton (51) angegebene Konzentration in der Größenordnung von 10^{-5} ml/ml als für das Hefewachstum zu hoch erwies. Es fand keine Zellvermehrung statt. Im übrigen zeigt das Anionen-Detergens dort, wo unter Kationen Hemmung des Hefewachstums auftrat, signifikante Steigerung als Eigeneffekt bis zu 41 % (Versuch M 21), bei 10^{-7} ml/ml ist die Wirkungsgrenze erreicht. Im Versuch M 22 kommt es im Vergleich zu den Fermentansätzen ohne Detergens zu einer signifikanten Steigerung des DNase-Effekts, wenn man den negativen Eigeneffekt der Kontrollen (0-Ansätze) berücksichtigt.

Diese Ergebnisse mit ionisierten Detergentien scheinen zunächst in Widerspruch 1. zu den Angaben von Dyar und Ordell (51), daß die Zellmembran negativ geladen sei, zu stehen und 2. zu den Ergebnissen von Bennet (3), daß Kationen Pinocytose-Induktoren seien. Hierzu ist zu sagen, daß die Reaktion unseres Nährmediums in dem für das Hefewachstum optimalen sauren Bereich von pH 4,5 liegt, dieses ist nun ebenfalls ein für die Anionen-Detergentien optimales Milieu, während die Kationen ihre Wirkung eher im neutralen bis basischen Bereich entfalten können. Putnam (51) vermutet, daß es sich bei diesem Phänomen der Aktivitätssteigerung nicht um eine mehr oder weniger ausgesprochene Ionisierung des Detergens, sondern um eine Änderung der Zelloberfläche

handelt. Wir könnten in unserem Fall annehmen, daß sich die H-Ionen an der Zellmembran anreichern und sie damit positiv aufladen. Natrium-Tetra-Decyl-Sulfat wandert zur Anode, d.h. der Zellmembran, reichert sich dort an und fördert durch Herabsetzung der Oberflächenspannung die Aufnahme der DNase in die Zelle.

Tab. 3 (Fortsetzung)

Vers. Nr.	Konz. d. Tween ml/ml	Alter der Kultur	Trübung in 0	%uale Steigerung	Konz. d. DNase 10^{-6} g/ml	Trübung in F	%uale Steigerung	Signifikanzniveau
							0	F
TM 6	10^{-5}	22	$50,3 \pm 3,4$	+ 4,8	0,3	$50,6 \pm 2,5$	$\emptyset$	$\emptyset$
		46	$89,7 \pm 3,1$	$\emptyset$		$92,6 \pm 1,6$	- 2,7	$\emptyset$
M 2	5×10^{-5}	47	$39,2 \pm 1,3$	+ 40,0	0,1	$29,2 \pm 0,9$	+ 4,8	p = 0,001 p = 0,01
TM 6	10^{-5}	22	$50,3 \pm 3,4$	+ 4,8	0,1	$49,3 \pm 2,7$	$\emptyset$	$\emptyset$
		46	$89,7 \pm 3,1$	$\emptyset$		$84,0 \pm 2,9$	- 3,1	$\emptyset$
		22	$50,3 \pm 3,4$	+ 4,8	0,03	$49,0 \pm 1,7$	$\emptyset$	$\emptyset$
		46	$89,7 \pm 3,1$	$\emptyset$		$87,2 \pm 2,9$	+ 2,2	$\emptyset$

Tab 3 (Fortsetzung)

Vers., Konz.d. Nr. Tween ml/ml	Alter der Kultur	Zellzahl in 0	%uale Steigerung	Konz.d. DNase	Zellzahl in F	%uale Steigerung unter DNase	Signifikanzniveau
				10 ⁻⁶ g/ml		0	F
M 1	5 x 10 ⁻⁵	16 37,9 ± 6,5 42 38,5 ± 9,1	+ 9,1 + 6,3	5	41,4 ± 6,7 48,3 ± 8,7	+ 7,9 - 2,6	ø ø
M 11	10 ⁻⁵ 10 ⁻⁶ 10 ⁻⁷	22 54,8 ± 10,3 36,5 ± 9,1 44,2 ± 6,1	+ 30,2 - 13,3 + 5,0	5	72,8 ± 9,8 69,1 ± 12,8 67,2 ± 16,5	+ 7,2 + 1,8 - 1,0	ø ø ø
M 4	10 ⁻⁷	45 50,8 ± 8,3	ø	5	62,9 ± 9,5	ø	ø
M 13	10 ⁻⁵	16 55,1 ± 11,1	+ 15,8	2	58,2 ± 10,0	+ 5,6	p = 0,01 p = 0,001
M 14	10 ⁻⁵ 10 ⁻⁶	21 39,5 ± 8,0 39,3 ± 8,1	+ 2,6 + 2,6	0,5	45,0 ± 7,3 42,8 ± 4,7	+ 6,6 + 1,4	ø ø
M 2	5 x 10 ⁻⁵	47 39,9 ± 3,5	+ 16,0	0,1	31,9 ± 6,3	ø	p = 0,001 ø

Tab. 3 (Fortsetzung)

Vers. Nr.	Konz. d. Tween ml/ml	Alter d. Kultur	Sedimentvol. in 0	%uale Steigerung	Konz. d. DNase 10^{-6} g/ml	Sedimentvol. in F	%uale Steigerung unter DNase	Signifikanzniveau
								0 F
M 1	5×10^{-5}	16	2,1 $\pm$ 0,18	+ 50,0	5	3,0 $\pm$ 0,24	+ 30,4	p = 0,001 p = 0,001
		44	2,4 $\pm$ 0,0	+ 12,6		4,2 $\pm$ 0,2	+ 20,0	p = 0,001 p = 0,001
M 11	10^{-5}	22	3,7 $\pm$ 0,2	+ 5,7	5	4,3 $\pm$ 0,24	+ 7,5	$\emptyset$
	10^{-6}		2,9 $\pm$ 0,26	- 17,1		4,0 $\pm$ 0,17	$\emptyset$	p = 0,01
	10^{-7}		2,9 $\pm$ 3,2	- 17,1		4,0 $\pm$ 0,27	$\emptyset$	p = 0,01
M 4	10^{-7}	45	2,5 $\pm$ 0,24	+ 6,7	5	4,2 $\pm$ 0,17	+ 9,3	$\emptyset$ p = 0,01
M 13	10^{-5}	16	3,2 $\pm$ 0,2	+ 4,9	2	3,6 $\pm$ 0,32	- 2,7	$\emptyset$
M 14	10^{-5}	21	3,1 $\pm$ 0,45	- 6,2	0,5	2,9 $\pm$ 0,4	- 5,5	$\emptyset$
	10^{-6}		3,1 $\pm$ 0,25	- 4,2		2,9 $\pm$ 0,28	- 5,2	$\emptyset$
M 2	5×10^{-5}	47	2,7 $\pm$ 0,3	+ 42,1	0,1	2,2 $\pm$ 0,2	+ 4,7	p = 0,001

Tab. 4

Vers. Nr.	Konz. d. Kation ml/ml	Alter der Kultur	Trübung in 0	%uale Steigerung	Konz. d. DNase 10^{-6} g/ml	Trübung in F	%uale Steigerung unter DNase	Signifikanzniveau
								0 F
M 23	10^{-5}	40	9,25 $\pm$ 0,3	- 69,75				$p = 0,001$
	10^{-6}		26,81 $\pm$ 3,2	- 12,4				$p = 0,01$
	10^{-7}		31,08 $\pm$ 3,7	+ 1,6				$\emptyset$
	10^{-8}		31,25 $\pm$ 3,9	+ 2,1				$\emptyset$
	10^{-9}		31,5 $\pm$ 3,4	+ 3,8				$\emptyset$
M 24	10^{-6}	36	22,5 $\pm$ 1,2	- 3,6	5	27,08 $\pm$ 2,3	- 41,0	$\emptyset$ $p = 0,001$
	10^{-7}		25,83 $\pm$ 1,8	+ 10,7		42,5 $\pm$ 2,5	- 7,3	$p = 0,001$ $p = 0,001$
	10^{-8}		23,5 $\pm$ 2,3	$\emptyset$		40,3 $\pm$ 2,4	- 12,0	$\emptyset$ $p = 0,001$
	10^{-9}		24,0 $\pm$ 1,7	+ 2,9		37,0 $\pm$ 2,33	- 19,1	$\emptyset$ $p = 0,001$

Tab. 5

Vers. Nr.	Konz. d. Anion ml/ml	Alter der Kultur	Trübung in 0	%uale Steigerung	Konz. d. DNase 10^{-6} g/ml	Trübung in F	%uale Steigerung	Signifikanzniveau
								0 F
M 21	5×10^{-6}	46	$48,83 \pm 5,7$	+ 41,5				p = 0,001
	10^{-6}		$36,92 \pm 2,2$	+ 7,0				$\emptyset$
	5×10^{-7}		$39,17 \pm 3,0$	+ 13,5				p = 0,001
	10^{-7}		$38,33 \pm 6,4$	+ 11,1				$\emptyset$
	5×10^{-8}		$36,58 \pm 5,8$	+ 6,6				$\emptyset$
	10^{-8}		$36,0 \pm 3,0$	+ 4,3				$\emptyset$
M 22	10^{-9}	36	$26,7 \pm 2,8$	- 2,4	5	$39,66 \pm 2,5$	$\emptyset$	$\emptyset$
	10^{-8}		$25,0 \pm 2,0$	- 8,5		$39,16 \pm 1,7$	+ 10,0	p = 0,01
	10^{-6}		$25,8 \pm 1,7$	- 6,5		$41,16 \pm 2,5$	+ 10,0	p = 0,01
	5×10^{-6}		$29,4 \pm 1,6$	+ 7,6		$41,5 \pm 2,2$	+ 4,4	p = 0,01

IV. Wirkung der Desoxyribonuklease I auf
Wachstum und Vermehrung von Hefezellen.

Ergebnisse

Ochs (32), der als erster die DNase-Wirkung auf Hefezellen getestet hat, stützt sich in seinen Arbeiten auf Messungen im Photometer Eppendorf und auf Sedimentvolumenbestimmung. Wir mußten uns nun fragen, ob es sich bei den von ihm erzielten Ergebnissen um reine Zellvermehrung oder um Zellwachstum oder um beides handelt.

In zwei Orientierungsversuchen fanden wir folgende Werte:

Versuch M 1 (mit 5×10^{-6} g/ml DNase, Messung nach 42 Stunden)

Trübung in 0 (Kontrollen)	normiert auf 100	Trübung in F (Fermentansatz)	in % von den Kontrollen
31,1 + 1,5	100	57,1 + 0,8	183,6

Sedimentvol. in 0	normiert auf 100	Sedimentvol. in F	in % von den Kontrollen
2,13 + 0,02	100	3,54 + 0,19	166,5

Zellzahl in 0	normiert auf 100	Zellzahl in F	in % von den Kontrollen
36,2 + 5,7	100	49,6 + 6,4	137,0

Versuch M 4 (mit 5×10^{-6} g/ml DNase, Messung nach 45 Stunden)

Trübung in 0 (Kontrollen)	normiert auf 100	Trübung in F (Fermentansatz)	in % von den Kontrollen
40,4 + 5,0	100	73,2 + 1,75	181,1

Sedimentvol. in 0	normiert auf 100	Sedimentvol. in F	in % von den Kontrollen
2,37 + 0,28	100	3,84 + 0,27	162,0

Zellzahl in 0	normiert auf 100	Zellzahl in F	in % von den Kontrollen
50,75 + 16,2	100	63,83 + 9,9	126,0

Aus diesen Messungen geht hervor, daß die Trübungssteigerung nicht direkt proportional der Zellzunahme ist. Zum anderen ist ersichtlich, daß das Zellsedimentvolumen mehr zugenommen hat, als es der Zellvermehrung entsprechen würde. Im Ganzen scheint das Gewicht der DNase-Wirkung mehr auf dem Zellwachstum als auf der Zellvermehrung zu liegen. Es liegt allerdings die Vermutung nahe, daß es sich hier um Hefezellen handelt, die aus einem Mangelmedium kommend nun erst für eine gewisse Zeit ihre Proteinsynthese in den Dienst des Zellwachstums stellen, wie es Hill et. al. (13 b) an Fibroblasten beobachtete.

Um einen genaueren Einblick in die einzelnen Phasen der DNase-Wirkung auf Hefezellen zu bekommen, haben wir in einem großangelegten Versuch noch eine weitere Methode ausgearbeitet und hinzugenommen, deren Technik oben bereits geschildert wurde, nämlich Photographie und Planimetrie.

Versuch M H (siehe Tab. 1)

Es konnten die Ergebnisse von Ochs (32) bestätigt werden; die durch Photometrie, Sedimentvolumenbestimmung und Zellzählung gewonnenen Wachstumskurven (s. Abb. 1 - 3) verlaufen zunächst parallel im Sinne der "lag phase" (Morris, 31), dann trennen sie sich. Diejenige der F-Ansätze verläuft steiler nach etwa 10 Stunden (logarithmische Phase) und erreicht nach ca. 30 bis 40 Stunden ein Plateau ("stationary phase"). Auch in unseren Versuchen holt der O-Ansatz während der Beobachtungszeit von 68 Stunden den F-Ansatz nicht ein.

Weiter zeigt sich auch hier wie in den beiden Vorversuchen, daß die Trübungswerte den Sedimentvolumenwerten, bzw. der Zellzahl nicht direkt proportional sind. Der deutliche Unterschied zwischen Sedimentvolumen und Zellzahl kommt hier allerdings nicht zum Ausdruck, was, wie schon anfangs erwähnt, mit der Vitalität der Hefezellen zusammenhängen kann. Wir hätten es in diesem Fall mit einer besonders frischen Kultur zu tun. Im

übrigen zeigt sich eine bereits nach 18 Stunden hochsignifikante

Steigerung des Zellwachstums sowie der Zellvermehrung der DNase-Werte im Vergleich zu den Kontrollen in allen drei Meßarten. Wir haben nun die Größenverteilung in den einzelnen Zeitabschnitten gemessen. Aus den Ergebnissen der Planimetrie (s. Tab. 2) stellten wir Verteilungskurven auf (s. Abb. 4 - 9), wobei jeweils 40 Planimeter-Einheiten (P. E.) zusammengefasst wurden. Es kann gezeigt werden, daß schon nach 6 Stunden eine Rechts- und Linksverbreiterung, sowie eine Abflachung der Kurven auftreten. Das heißt, daß die Zellen sowohl größer werden, als auch beginnen, Knospen zu treiben. Die DNase-Wirkung deutet sich bereits durch höhere Werte im "Knospenbereich" (40 - 100 PE) an. Nach 18 Stunden hat sich die durchschnittliche Zellgröße von 300 PE bei 6 h auf 375 PE erhöht. Die Hefezellen sind in die logarithmische Phase eingetreten, es werden unter DNase deutlich mehr Knospen gebildet als in den Kontrollen. Die 28-, 44- und 68-Stunden-Werte zeigen ein allmähliches Nachlassen der Zellvermehrung, jedoch eine erhebliche Zunahme der Zellgröße, die sowohl bei den Fermentansätzen als auch bei den Kontrollen zu beobachten ist. Letztere bleiben aber immer hinter den DNase-Zellen zurück. Die durchschnittliche Zellgröße liegt am Ende des Versuchs um 400 PE (Ausgangswert 220 PE).

Zusammenfassend kann folgendes gesagt werden:

1. Aus den ursprünglich annähernd gleichgroßen Hefezellen (hohe schmale Kurve) entwickeln sich innerhalb von 68 Stunden Beobachtungszeit stark unterschiedlich große Zellen, eine allgemeine Vermehrung und Vergrößerung ist feststellbar (flache breite Kurve).
2. Die Verteilungskurven der Fermentansätze zeigen dieses Bild besonders ausgeprägt; d.h. die DNase-Zellen sind im Wachstum wie auch in der Vermehrung aktiver (Rechts- und Linksverbreiterung der Kurven).
3. Am Ende der Beobachtungszeit findet kaum mehr Zellvermehrung statt, die DNase-Wirkung zeigt sich jedoch noch deutlich im Zellwachstum (Rechtsverschiebung der Kurven).

Umrechnung der Planimetereinheiten in absolute Werte

Wir haben bei der Umrechnung der Planimeterwerte zwei Faktoren zu berücksichtigen. 1. Vergrößerung durch Mikroskop und Projektor (= 6500 fach), 2. Planimeterfaktor ($p = 0,787$), durch den die Planimeterwerte dividiert werden müssen um r^2 in mm^2 zu erhalten. Bei der Ausrechnung des mittleren Zellradius (Zellvolumens) sind wir folgendermaßen vorgegangen:

gemessene mittlere Fläche in PE	$\times 1/0,787$ $= r^2 (\text{mm}^2)$	$r (\text{mm})$	$\times 1/6500$ $= \text{absol. } r$ (10^{-3} cm)	
238	302	17,4	2,676	0 F t= 0 Stunden
309	392	19,8	3,045	0 F t= 6 Stunden
310	394	19,8	3,045	
354	449	21,2	3,261	0 F t= 18 Stunden
356	452	21,3	3,276	
375	476	21,8	3,353	0 F t= 28 Stunden
415	527	23,0	3,537	
417	529	23,0	3,537	0 F t= 44 Stunden
459	583	24,1	3,707	
440	559	23,6	3,630	0 F t= 68 Stunden
437	555	23,6	3,630	

Aus r läßt sich das Volumen der Hefezellen nach der Formel $V = 4/3 r^3$ ausrechnen. Da mit der Sedimentvolumenbestimmung ebenfalls das Volumen der Zellen gemessen wird, mußten dort etwa gleiche Werte für die Zellgröße erwartet werden. Die Sedimentvolumenwerte aus diesem Versuch beziehen sich auf 16 ml Hefesuspension, 1 Hämatokrit-Einheit entspricht 2 mm^3 . Das heißt, daß die Sedimentvolumen-Ergebnisse mit 2 multipliziert werden müssen, um mm^3 zu erhalten. Das aus dem r der Planimeterwerte errechnete Zellvolumen haben wir mit der Zellzahl in 16 ml Hefelösung multipliziert und die Ergebnisse in nachfolgender Tabelle eingetragen.

mittleres Vol. in 10^{-9} cm^3 nach Pl.	Zellzahl pro ml	Vol. d. Zel- len/16 ml nach Plani- metrie	Sed. vol. in H. E.	Sed. vol. in 10^{-9} cm^3	
80,2	1344×10^3	1725	1,100	2200	0 F t= 0 h
118,6	1640×10^3	3112	1,820	3640	0 t= 6 h
118,6	1396×10^3	2649	1,870	3740	F t= 18 h
143,2	1704×10^3	3904	2,650	5300	0 t= 28 h
147,2	1888×10^3	4453	2,950	5900	F t= 44 h
157,0	1840×10^3	4422	3,330	6660	0 t= 68 h
185,4	2312×10^3	6858	3,970	7940	F
185,4	1952×10^3	5790	3,600	7200	0 t= 68 h
214,0	2244×10^3	7667	4,200	8400	F
199,6	1916×10^3	5879	3,350	6700	0 t= 68 h
199,6	2380×10^3	7601	4,300	8600	F

Der Vergleich zwischen durch Planimetrie und Sedimentvolumenbestimmung errechneten Werte ergibt, daß letztere höher liegen und zwar um einen Faktor von durchschnittlich 1,25 (1,09 bis 1,5). Wir haben die Ursache dafür in den Sedimentvolumina gesucht. Die Erklärung dürfte sein, daß die Hefezellen im Sediment infolge ihrer sphärischen Form nicht fugenlos aneinander liegen können. Es bleiben also Zwischenräume ausgespart, die mitgemessen wurden.

Tab. 1

Alter der Kultur in Stunden	Trübung in 0	%uale Steigerung	DNase-Konzentr. 10^{-6} g/ml	Trübung in F	%uale Steigerung unter DNase	Signifikanz Niveau
6	16,4 ± 0,3	100 ± 1,5	5	17,7 ± 0,4	+ 7,9	ϕ
18	28,2 ± 1,4	100 ± 4,9		35,3 ± 2,5	+ 25,1	p = 0,001
28	37,2 ± 0,8	100 ± 2,2		58,4 ± 2,3	+ 56,9	p = 0,001
44	42,3 ± 2,1	100 ± 4,4		69,8 ± 3,5	+ 65,0	p = 0,001
68	47,1 ± 2,3	100 ± 2,5		92,6 ± 3,3	+ 96,5	p = 0,001

Alter der Kultur in Stunden	Sedimentvol. in 0	%uale Steigerung	DNase-Konzentr. 10^{-6} g/ml	Sedimentvol. in F	%uale Steigerung unter DNase	Signifikanz-Niveau
6	1,82 ± 0,003	100	5	1,87 ± 0,15	+ 2,7	ϕ
18	2,65 ± 0,91	100		2,95 ± 0,22	+ 7,5	p = 0,01
28	3,33 ± 0,48	100		3,97 ± 0,26	+ 19,2	p = 0,01
44	3,6 ± 0,22	100		4,2 ± 0,39	+ 16,2	p = 0,01
68	3,35 ± 0,21	100		4,3 ± 0,55	+ 22,2	p = 0,001

Tab. 1 (Fortsetzung)

Alter der Kultur in Stunden	Zellzahl in 0	%uale Steigerung	DNase-Konzentration 10^{-6} g/ml	Zellzahl in F	%uale Steigerung unter DNase	Signifikanz-Niveau
6	41,0 + 6,9	100		34,9 + 6,3	- 14,9	p = 0,001
18	42,6 + 6,8	100		47,2 + 7,4	+ 10,8	p = 0,01
28	46,0 + 7,4	100	5	57,8 + 7,7	+ 25,6	p = 0,001
44	48,4 + 6,9	100		56,1 + 7,6	+ 15,9	p = 0,001
68	47,0 + 7,1	100		59,5 + 9,5	+ 26,5	p = 0,001

Tabelle 2

Zell- größe in P.E.	0-Ansatz t = 0 Zahl %	F-Ansatz Stundung Zahl %	0-Ansatz t = 6 Zahl %	F-Ansatz Stundung Zahl %	0-Ansatz t = 18 Zahl %	F-Ansatz Stundung Zahl %
30			4 2,2			10 5,0
40-70			5 2,7	7 5,6	2 1,2	4 2,0
80-110		1 0,9		3 1,8	9 5,0	1 0,5
120-150	5 5,7	14 12,1	2 1,2	3 1,8	2 1,1	3 1,5
160-190	13 14,7	24 20,9	14 7,7	3 1,8	5 2,8	6 3,0
200-230	20 22,7	23 20,0	13 7,1	16 10,0	13 7,3	9 4,5
240-270	21 23,8	27 23,5	23 12,6	17 10,7	23 12,8	15 7,5
280-310	15 17,0	17 14,8	22 12,1	27 16,9	16 8,9	25 12,5
320-350	10 11,3	7 6,0	36 19,8	28 17,5	21 11,7	14 7,0
360-390	3 3,4		30 16,9	23 14,4	23 12,8	30 15,0
400-430	1 1,1	1 0,9	20 10,9	19 11,9	23 12,7	23 12,0
440-470		1 0,9	8 4,3	7 4,3	24 13,3	22 11,0
480-510			3 2,5	4 2,5	10 5,6	19 9,5
520-550			1 0,6	2 1,2	5 2,8	12 6,0
560-590				1 0,6	3 1,7	4 2,0
600-630					1 0,6	2 1,0
640-670						
680-710						
720-750						
760-790						
800-830						
840-880						

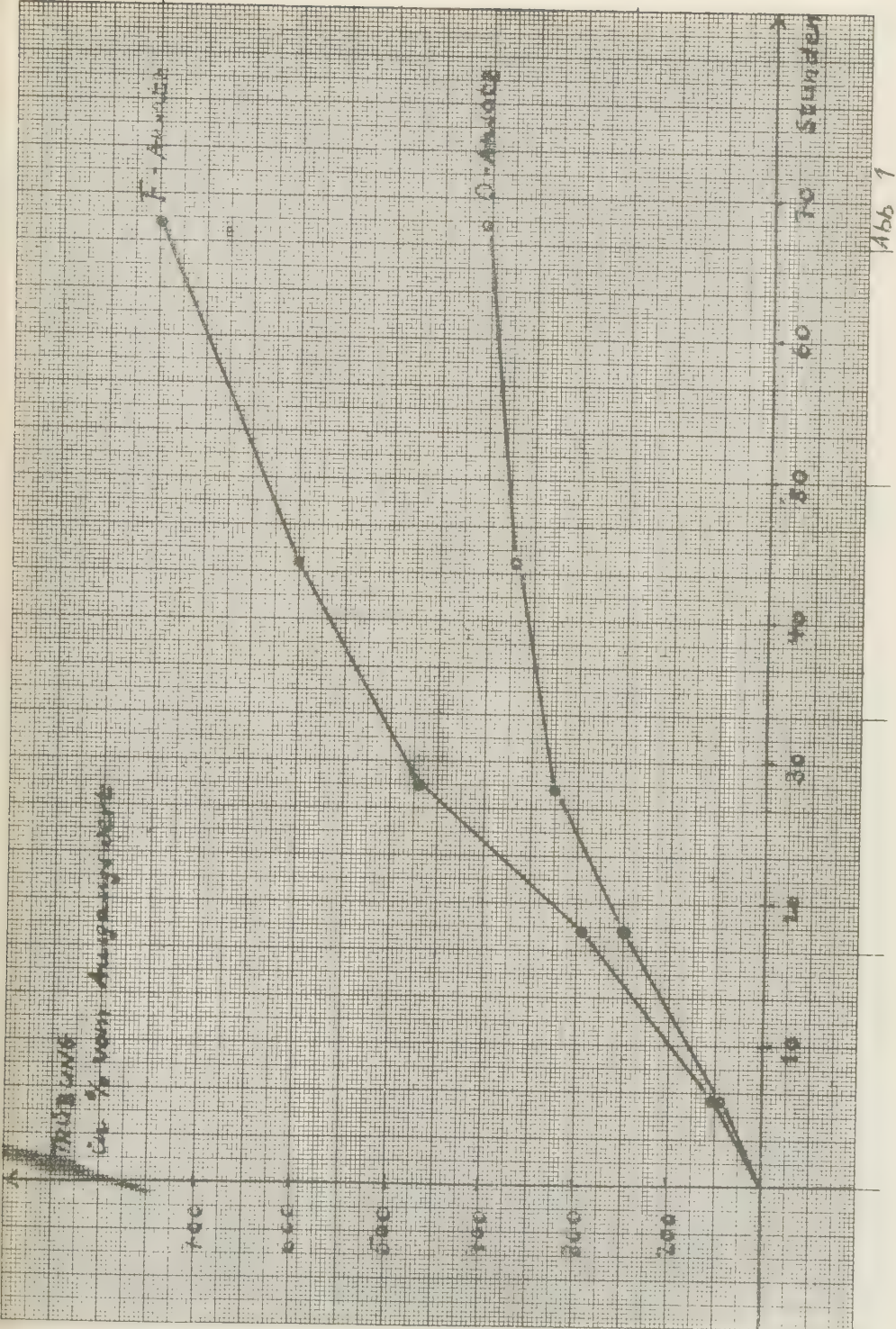
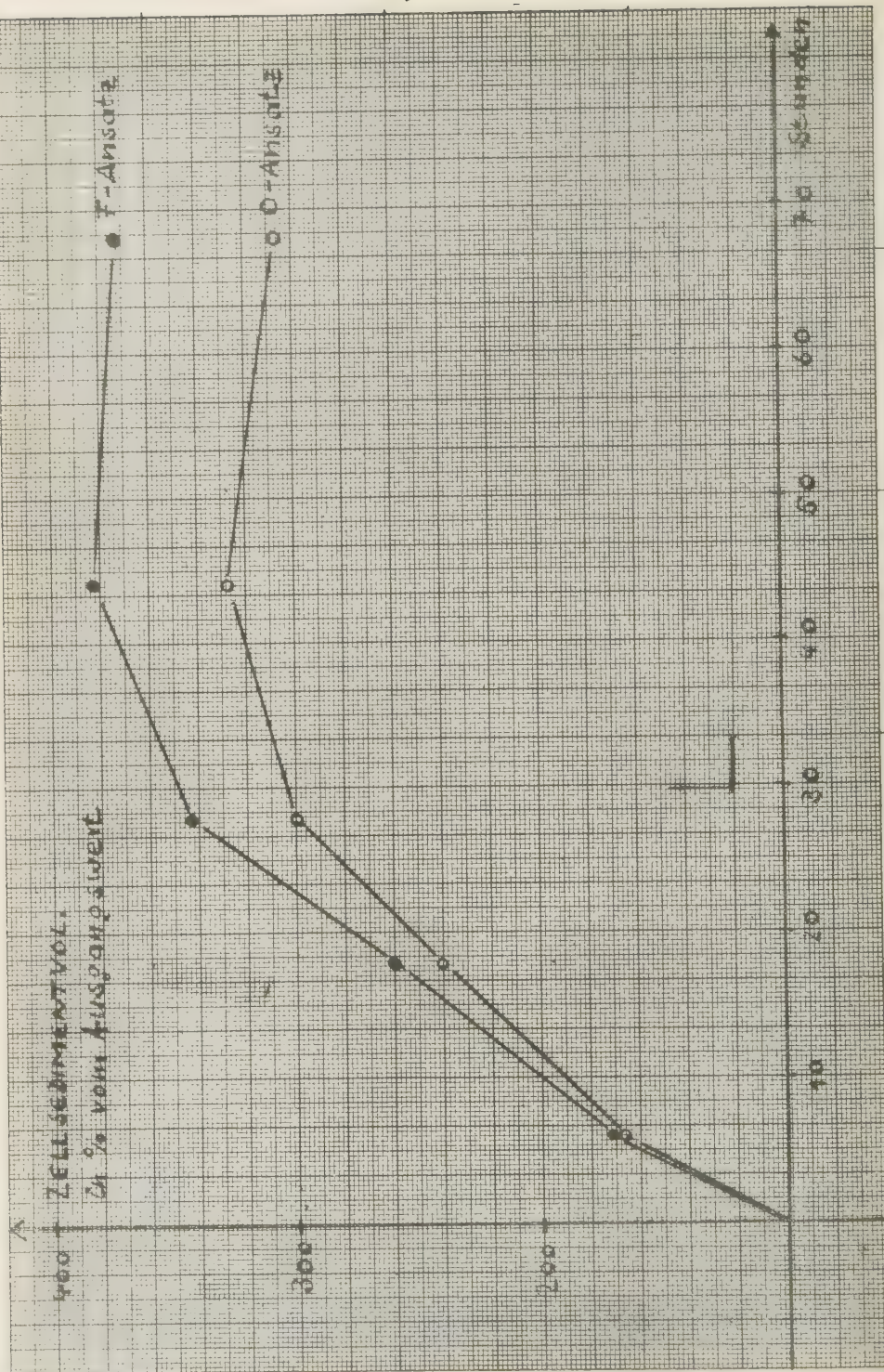
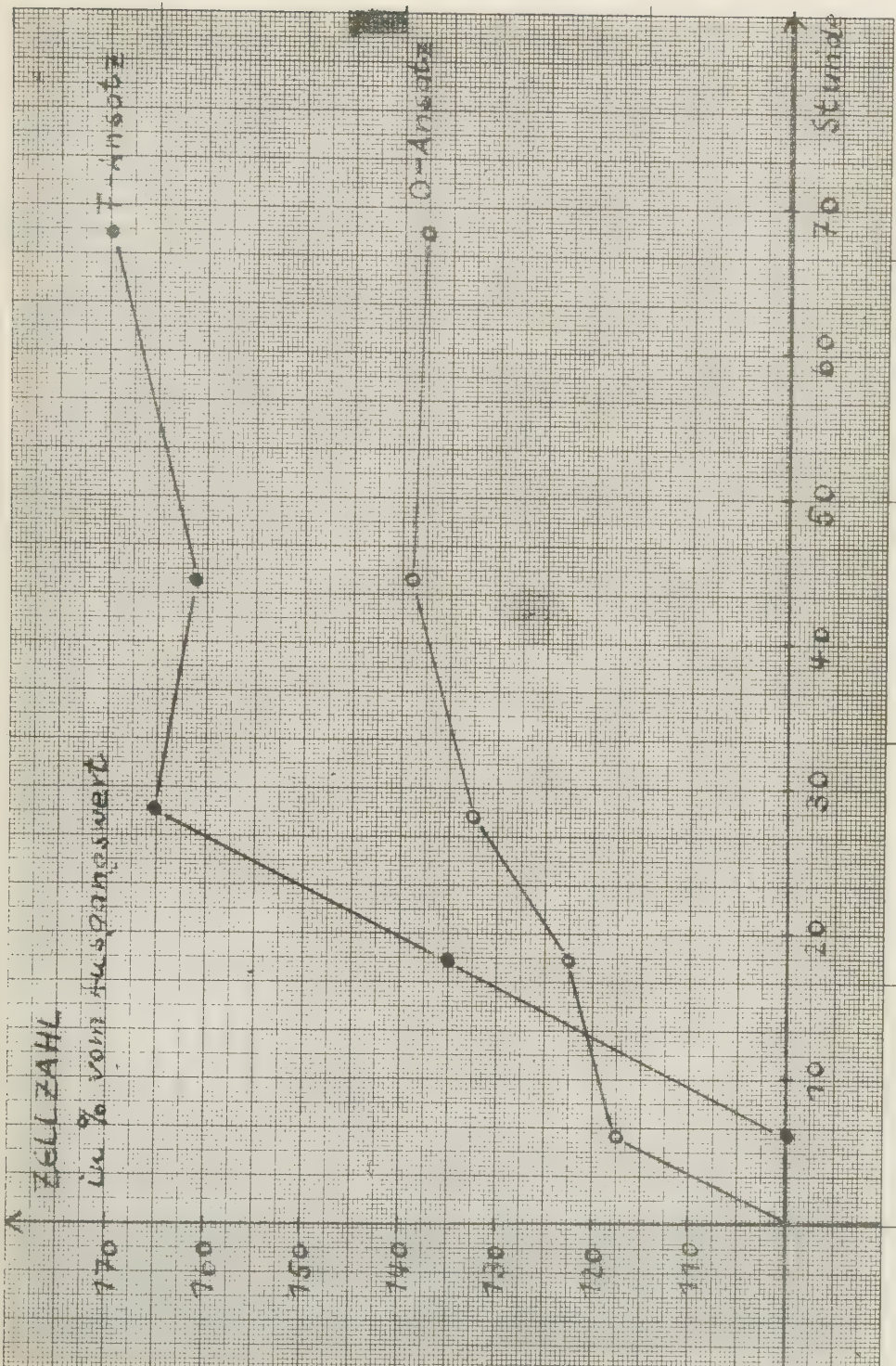


Abb 1





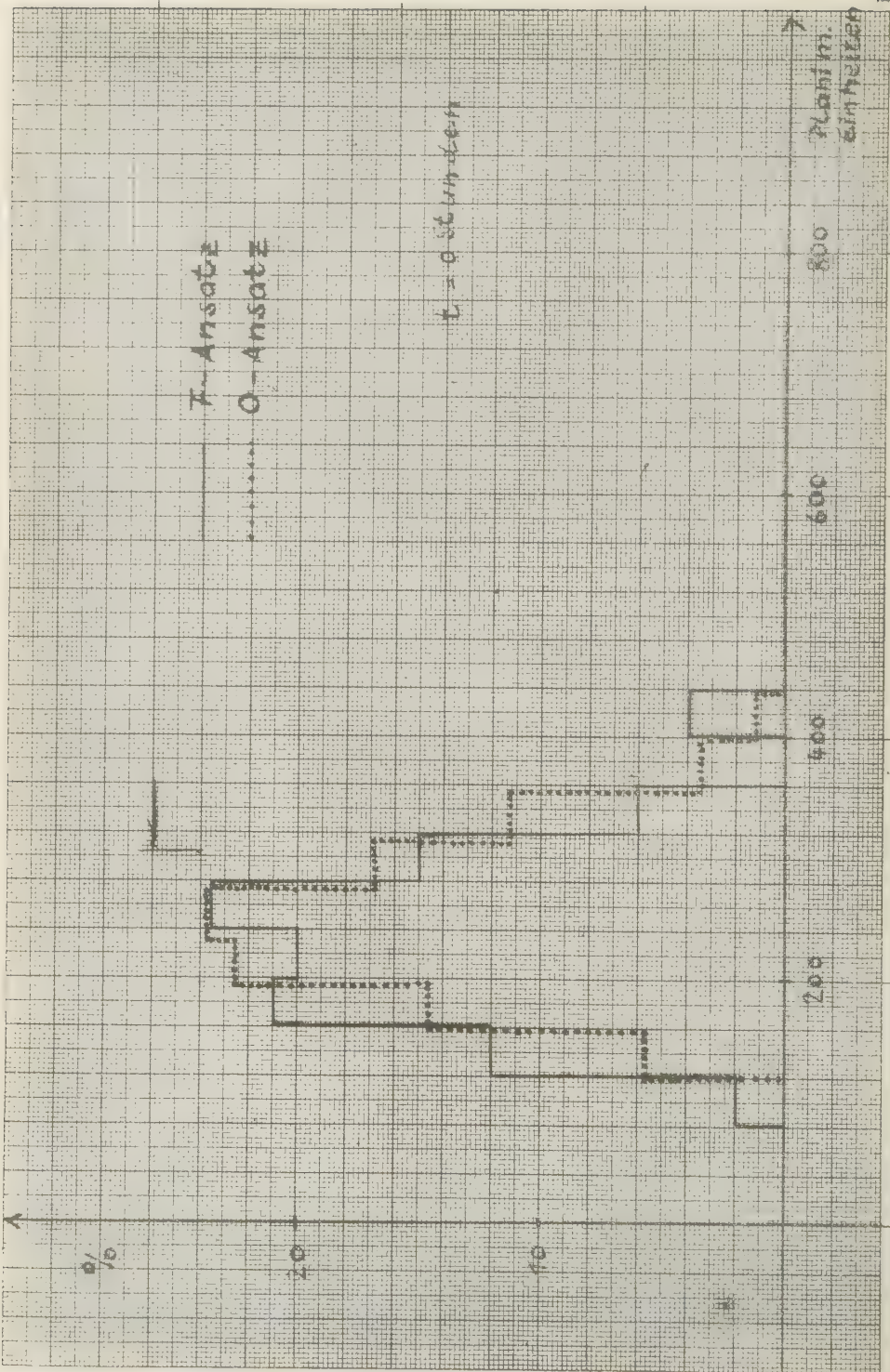
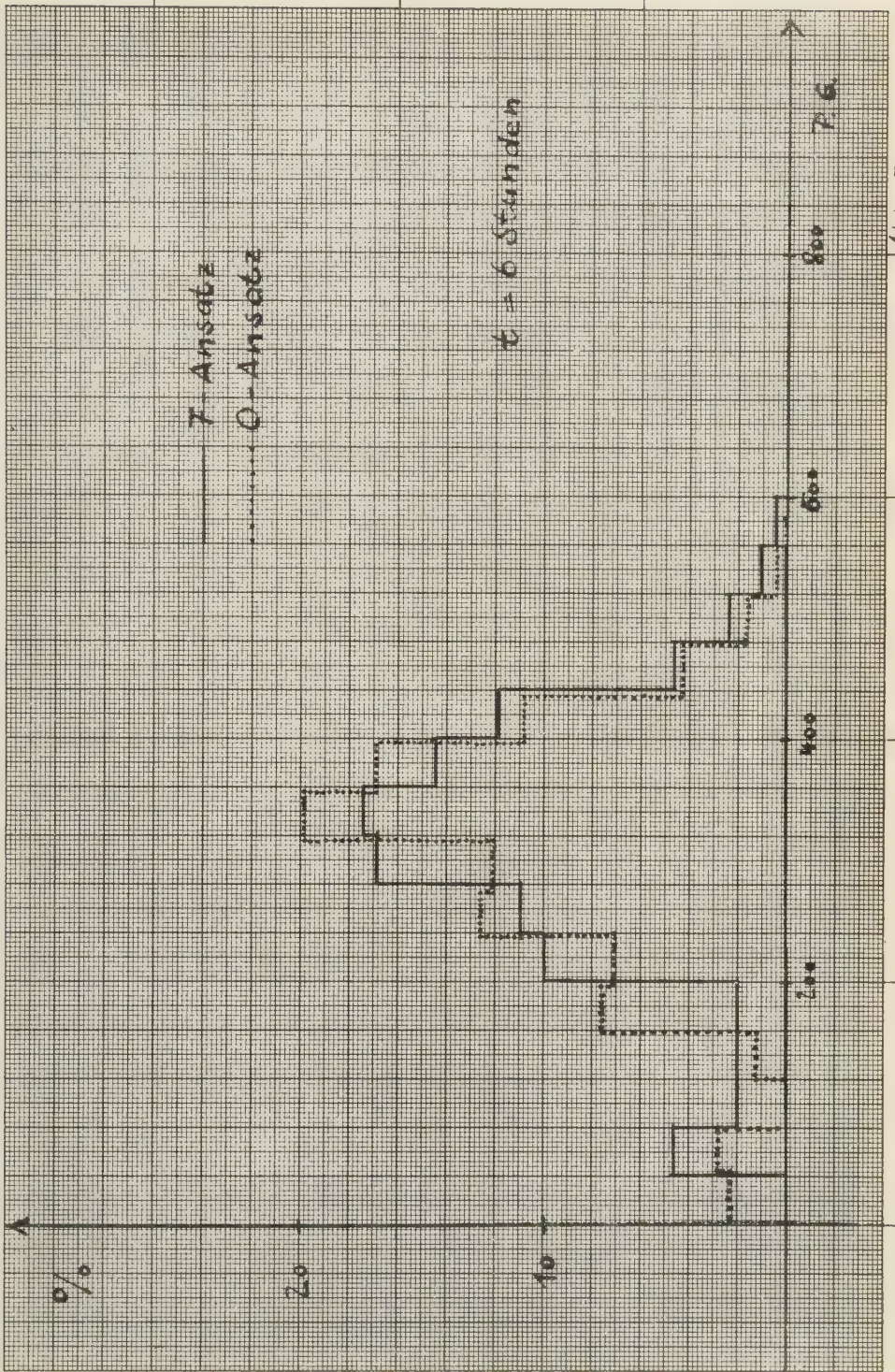
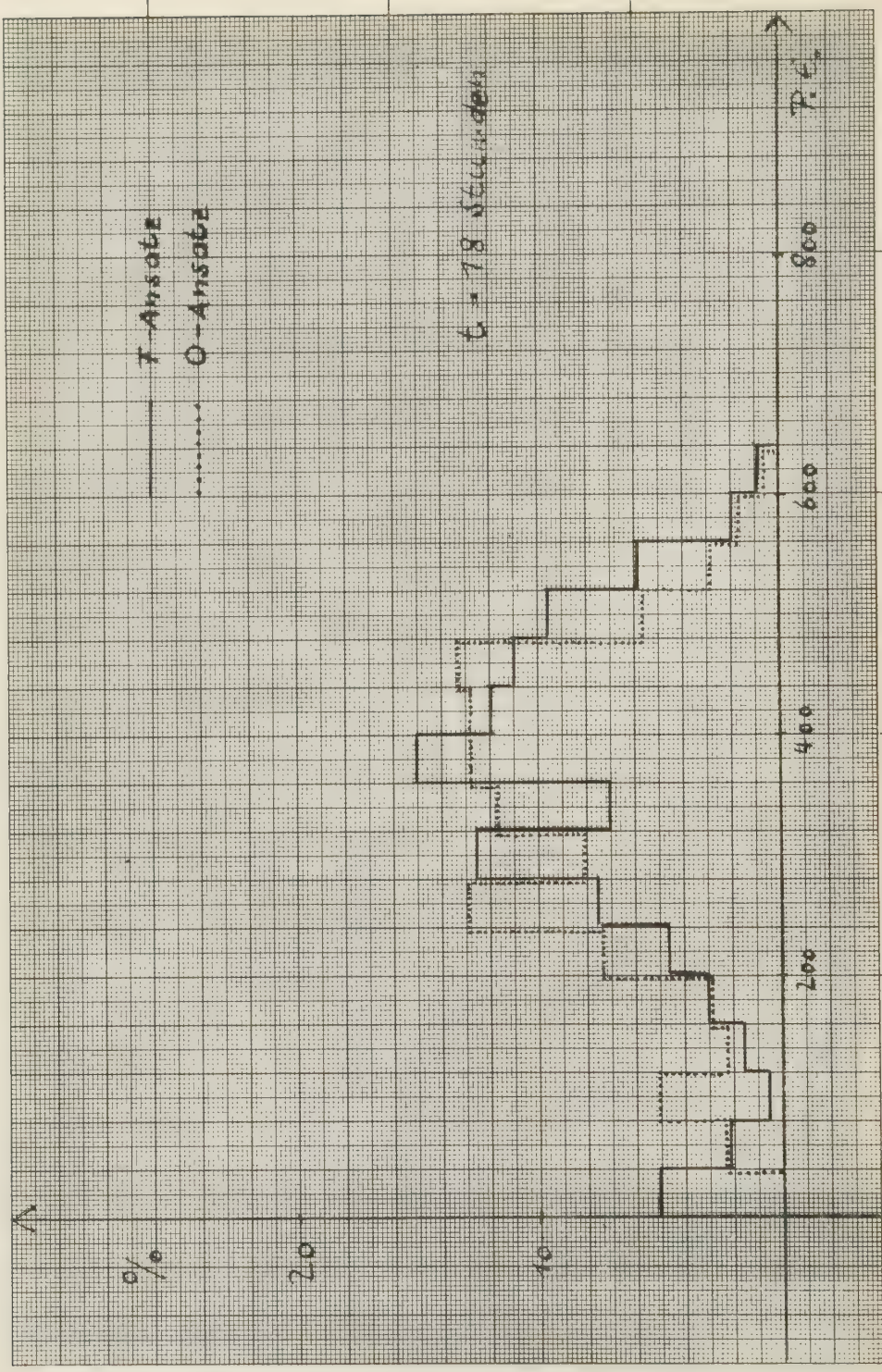
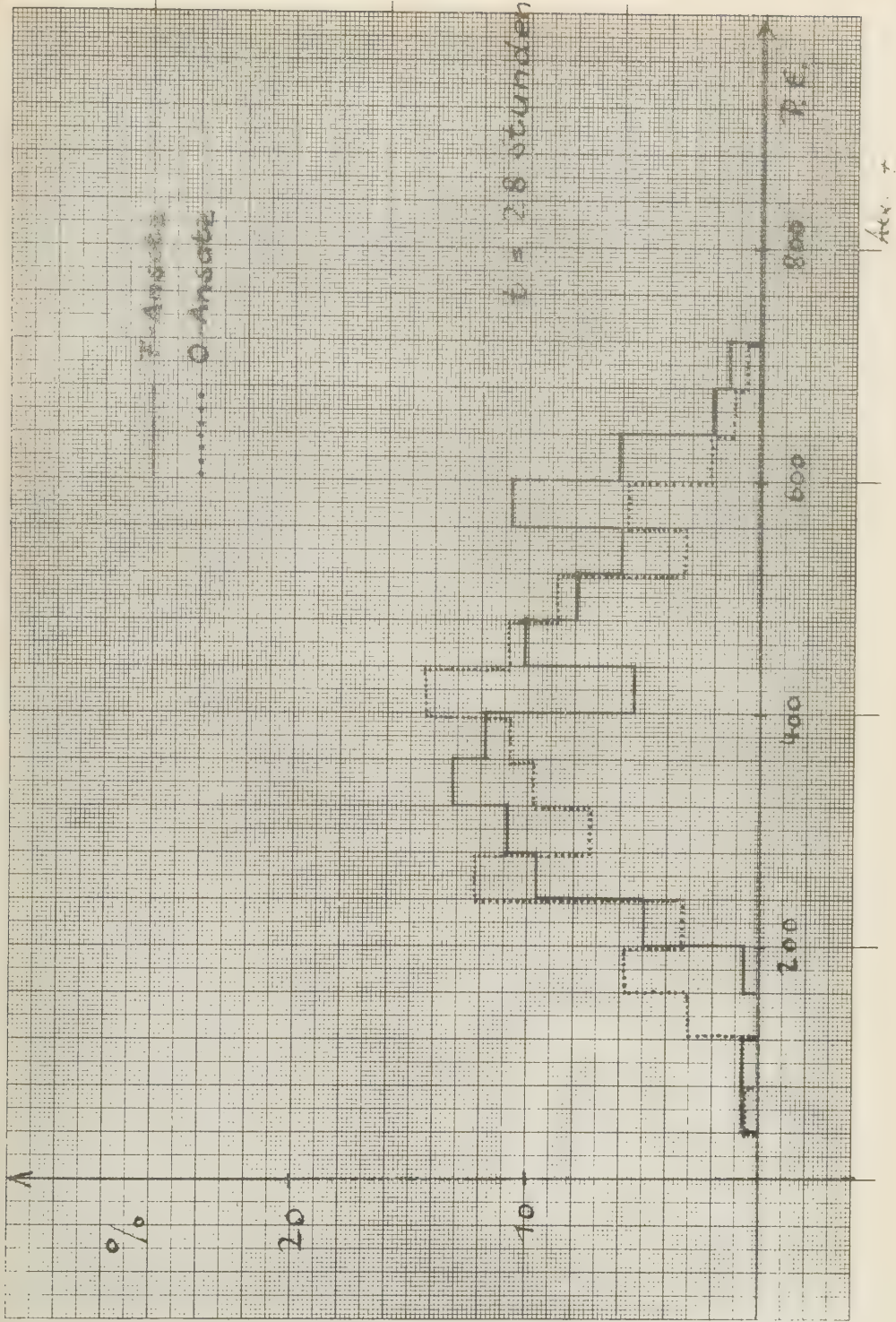
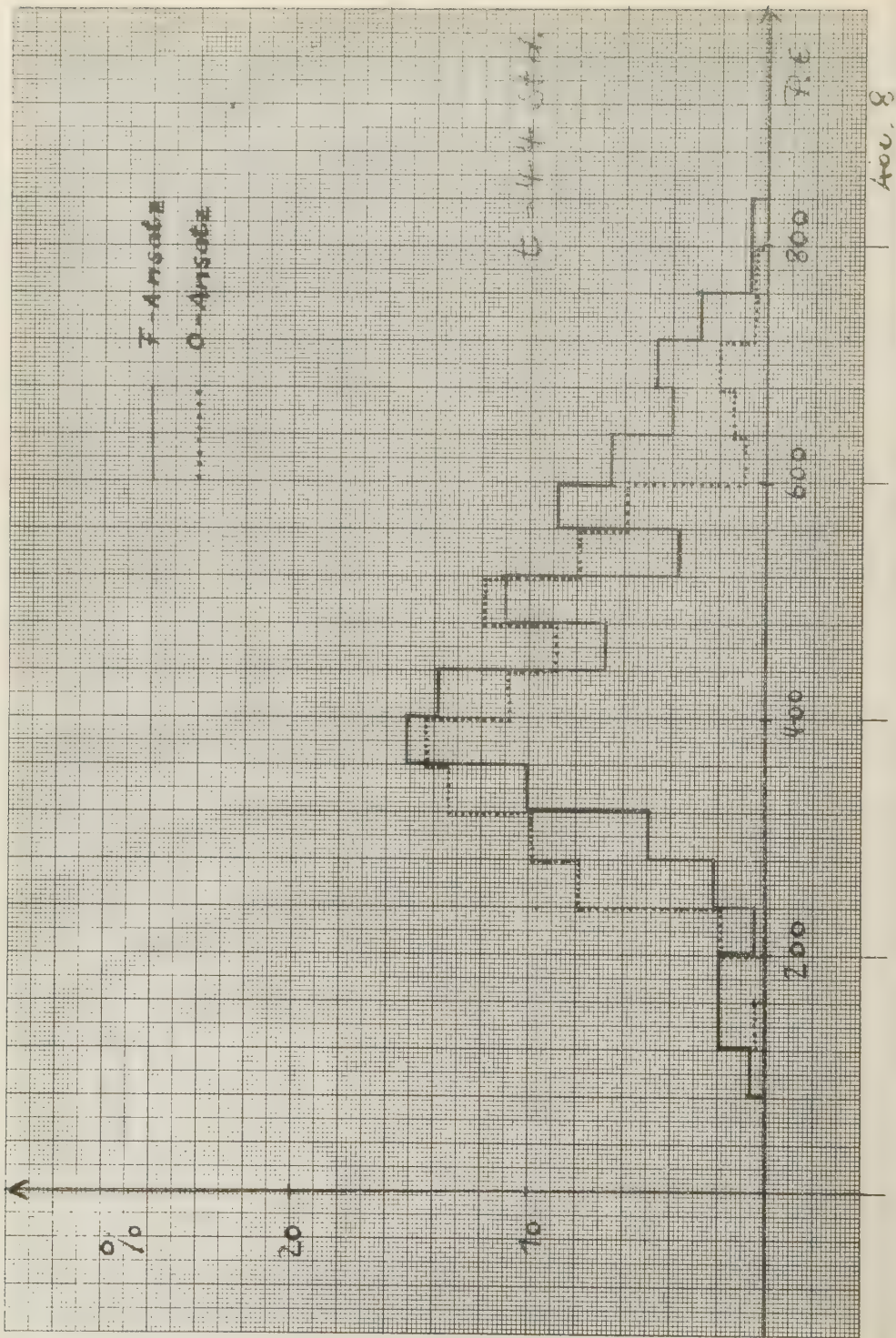


Abb. 4









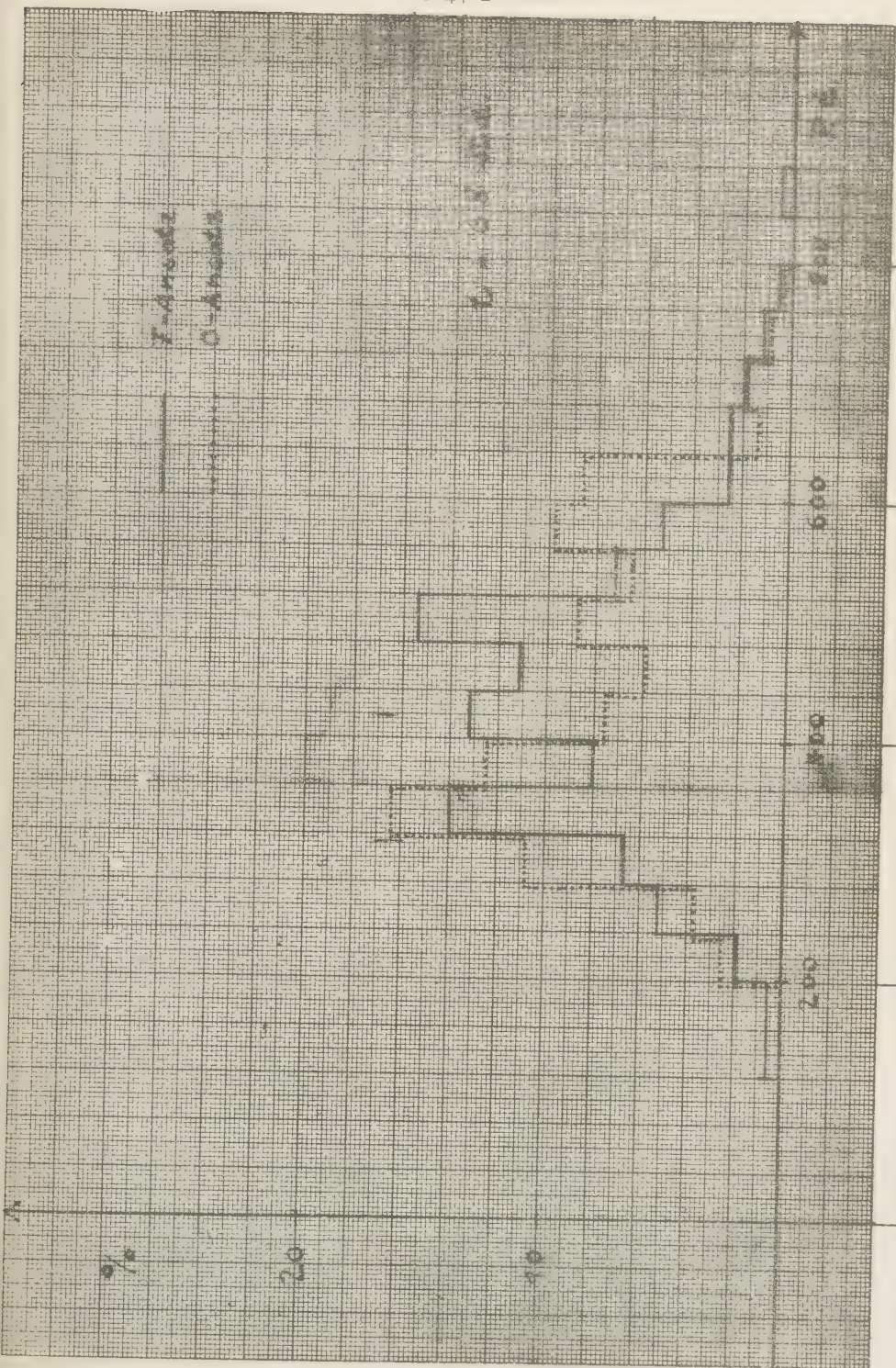


Abb. 9

V. Diskussion

In der Diskussion um die Wirkungsweise der DNase wurde immer wieder angeführt, daß sie außerhalb der Zelle wirke. Mit einer Reihe von Versuchsergebnissen läßt sich jedoch belegen, daß die DNase ein Ferment mit intrazellulärer Wirkung ist. Zahn (43) behandelte Seeigelleier mit 3×10^{-6} g/ml DNase I und erzielte eine signifikante Verkürzung der Teilungszeit, dagegen ließ sie sich durch 50×10^{-6} g/ml DNase I signifikant verlängern. Dies entspricht ganz den Beobachtungen von Chèvremont et al. (10), der an lebenden Fibroblasten und Myoblasten keine Steigerung der DNS-Synthese unter DNase I entdecken konnte. Drüberhinaus stellte er sogar eine Einschränkung der mitotischen Tätigkeit und Veränderungen in den Chromosomen fest. Bei niederen Organismen erreicht man noch mit $0,1 \times 10^{-6}$ g/ml DNase I signifikante Wachstumseffekte (Zahn an *Euglena gracilis*, 46, 47).

Der Einwand, die DNase wirke auf Grund ihrer chemischen Zusammensetzung, etwa indem sie die zur DNS-Synthese fehlenden Bausteine liefere, ließ sich leicht durch Versuche mit Rinderalbumin (49) und ein der DNase qualitativ sowie quantitativ entsprechendes Aminosäurengemisch (40) widerlegen. In beiden Fällen wurden keine Wachstumseffekte erzielt.

Auch die Annahme, die DNase wirke als ein Nukleotide lieferndes Ferment, läßt sich nicht mehr halten. Nukleotide allein, aber auch nach Vorbehandlung mit DNase verursachen keinen Wachstumseffekt (47). Das gleiche gilt für artfremde DNS. Sollte die DNase nur hydrolytisch wirken, müßte der Effekt mit DNase-inkubierter DNS sehr hoch sein. Im Versuch erwies sich artfremde DNS (und auch nach Zusatz von DNase) als wirkungslos. Nehmen wir einen über sie hydrolytisch Wirkung hinausgehenden DNase-Mechanismus an, etwa in der Mitose, es müßte der Effekt durch mitosefördernde Stoffe gesteigert werden, wie Ochs (32) mit Oestradiol-17-beta an Hefezellen nachweisen konnte. Die DNase muß also als ganzes Molekül die Plasmamembran durchdringen.

Als erster zeigte Fischer (11b), daß die Bakterienzelle auf

osmotische Reize reagiert; In hohen Salzkonzentrationen trat Plasmolyse, in destilliertem Wasser Plasmoptysis auf. Er beobachtete, daß Protoplast sich in Salzlösungen von der Zellwand abhob, woraus er auf eine semipermeable Plasmamembran schloß, Elektronenmikroskopisch ist der Nachweis einer Membran schwer zu erbringen, da sie sich zwar nach außen scharf abgrenzt, sich jedoch kontinuierlich ins Cytoplasma fortsetzt. Murray und Robinow (30) gelang die Färbung mit kleinen Mengen Viktoriablau. Chemisch handelt es sich wahrscheinlich um einen Monolayer aus vorwiegend Lipoiden, sowie aus Proteinen, Nukleinsäuren und Nukleotiden (26). Da die Zellwand für die Nahrungsaufnahme der Zelle nur eine geringe Rolle spielt (37), muß in der Zellmembran das Organ für die Auswahl der Stoffe gesucht werden. Mitchell (26, 27, 28) prägt den Begriff "Osmotic Barrier", welche der Aufrechterhaltung des osmotischen Gleichgewichts dient. Z. B. würde Hexose bei hoher Außenkonzentration über eine Träger-substanz solange in die Zelle geschleust werden, bis der intrazelluläre Hexosegehalt ein weiteres Abladen des Trägers verhindert (E. Heinz 13a)

Daneben ist jedoch noch ein anderer Mechanismus tätig, der sogenannte aktive Transport durch Fermentsysteme, die an den Stoffwechsel desjenigen Substrats gebunden sind, welches sie als chemische Gruppe transportieren und zwar gegen ein Konzentrationsgefälle (11, 29, 36, 13a).

Verschiedene Autoren haben nun nach noch anderen Möglichkeiten der Substrataufnahme gesucht. Viele Bakterienzellen zeigen Vakuolenstrukturen, welche keine konstanten Zellelemente darstellen, sondern abhängen von der Umgebung und der Stoffwechseltätigkeit der Zelle. Knaysi (16) vermutet auf Grund ihres osmotischen Verhaltens, daß diese Vakuolen mit einer der Plasmamembran ähnlichen, wenn nicht identischen Haut ausgekleidet sind. Shinohara (39) beschreibt einige feine schlauchförmige Strukturen in Actinomyceten- und Streptomycetenzellen, bestehend aus zwei parallelen Linien, die durch einen Spalt getrennt sind. Er vermutet, dies seien Mitochondrien. Möglicherweise handelt es sich auch

hier um Pinocytosevakuolen, wie sie schon von Chapman-Andresen und Holter (7) beschrieben wurden. Man war bisher der Auffassung, daß durch den Vorgang der Pinocytose nur Wasser in die Zelle geschleust werde, neuere Versuche haben jedoch ergeben, daß auch Hexosen, Albumine und Globuline auf diese Weise in die Zelle gelangen können. Chapman-Andresen und Holter (7) führten in Anwesenheit von Rinderplasmaalbumin C¹⁴-Glukose in Amöba Chaos-Chaos ein, deren Plasmamembran als extrem undurchlässig bekannt ist. Sie verfolgten das Schicksal des Materials durch direkte Messung der Radioaktivität und durch Autoradiographie. Sie stellten fest, daß Pinocytosevakuolen für Glukose durchlässig sind und daß diese auf normale Weise am Glukosestoffwechsel teilnimmt. Wichtig ist die Anwesenheit von Pinocytose-Induktoren. Chapman-Andresen (8) fand an Leukocyten, daß in Anwesenheit von Proteinen, besonders aber Gamma-Globulin und Lactoglobulin in Konzentrationen von 1 - 4 % innerhalb weniger Minuten Pinocytosenvakuolen auftraten. Auch Bennet (3) konnte diese mit Proteinen, besonders Kaninchen-Gammaglobulin, an Makrophagen hervorrufen, desgleichen mit bestimmten Kationen (Na und Ca) bei einer optimalen Konzentration von 0,1 Mol, jedoch unabhängig von den osmotischen Bedingungen. Als wirkungslos erwiesen sich alle Koblenhydrate und auch Nukleinsäuren. Untersuchungen von Schumaker (38) ergaben, daß von einer minimalen Konzentration ab Proteine schnell und in maximalen Mengen (bis zum Fünffachen des eigenen Proteinvolumen) von der Amöbenzelle aufgenommen werden können. Dieser Vorgang kann durch KCN, Dinitrophenol, niedere Temperaturen und extreme pH-Werte gehemmt werden. Holter und Holtzer (14) wiesen anhand von mikroskopischen Untersuchungen nach, daß folgende Gewebe Proteine (mit Flureszein markiert) durch Pinocytose aufnehmen: RES, Nierentubuluszellen, Intestinalepithel, sowie Kulturen von Helazellen, Ehrlichscher ascites, DBA-Ascites und lymphoider Zellen. Es wurde bei der Auswertung immer nur dort Pinocytose angenommen, wo sich flureszeierende Tröpfchen zeigten, nicht, wo Flureszenz diffus über das ganze Plasma verteilt auftrat. Über den Mechanismus der

Pinocytose herrscht noch keine völlige Klarheit. Grundsätzlich kommen zwei Möglichkeiten in Betracht und beide sind auch schon beobachtet worden (3, 19, 25):

1. Pseudopodienartige Ausstülpungen des Protoplasten, die das Substrat umschließen und in die Zelle hineinziehen (s. Abb. 10)
2. Schlauchförmige Kanälchen, in die das Substrat eindringt und an deren Boden es als Vakuolen abgeschnürt wird (s. Abb. 11)

Pappas und Brandt (33) wiesen elektronenmikroskopisch nach, daß der erste Schritt zur Pinocytose in der Anlagerung des Substrats an haarförmige Fortsätze der Zelle besteht. Sie testeten die Aufnahme zweier Protheine, RNase und Ferritin, und zweier kolloidaler Lösungen, Thoriumdioxid und Gold, an Amöba- Chaos-Chaos (s. Abb. 12). Unter RNase nimmt die Zahl der Plasmafortsätze ab, die einzelnen Härchen werden dicker - von durchschnittlich 50 - 80 Å auf 300 - 400 Å Durchmesser bei gleichbleibender Länge von 1000 - 2000 Å (s. Abb. 13 und 14). Diese Phänomen zusammen mit der elektronenmikroskopischen Beobachtung, daß sich die Partikel an der Oberfläche der Plasmafortsätze anreichern (s. Abb. 12) und später auch die Vakuolen und Schläuche besetzen (s. Abb. 11), spricht für eine Veränderung der Spannungsverhältnisse an der Zellmembran als auslösende Ursache für die Pinocytose.

Interessanterweise verliert die Vakuolenwand sehr schnell ihre Membraneigenschaften, die aufgenommenen Substanzen sind überall im Plasma nachweisbar (7, 9). Lewis (22) nahm an, daß die durch Pinocytose aufgenommenen Proteine zunächst enzymatisch zerstört werden und dann in das Plasma hineindiffundieren können, Holter (15), daß die Vakuolenmembran vom Cytoplasma angedaut werde, zerfalle und der Vakuoleninhalt dann frei werde. Dies ist aber nie beobachtet worden.

Wir meinen, daß das Verschwinden der Vakuolenmembran physikalisch ausreichend erklärt werden kann. Einen Plasmamembran entsteht immer dort, wo Plasma an fremde Medien angrenzt. Dort reichern sich die oberflächenbesetzten den Lipide an. In der Tat enthält die Membran 55 - 77 % der gesamten Zellipide, so daß

Weibull (42) von einem hochorganisierten Lipoidfilm spricht. Wird nun, wie bei der Pinocytose, Zellmembran in die Tiefe verlagert, so verliert sie, da die Grenzverhältnisse aufgehoben sind, auch ihre Membraneigenschaften, d.h. die Lipoide wandern ins Plasma ab und reichern sich wieder an der Zelloberfläche an. Der Vakuoleninhalt wird nun von keiner Membran mehr aufgehalten und kann ungehindert ins Plasma diffundieren. Dieser Mechanismus scheint uns für die Aufnahme hochmolekularer Stoffe, wie z.B. der DNase, von großer Bedeutung. Wie bereits oben erwähnt wurde, wird Pinocytose durch bestimmte Substanzen induziert. Getestet an Amöben sind diese, nach einer Zusammenstellung von Chapman-Andresen (9), folgende: Rinder-Plasmaalbumin, Beta-Laktoglobulin, Peptone, Tabak-Mosaik-Virus, RNase, Cytochrom-C, Lysozyme, Cystin, Glutathion und anorganische Salze (welche nach Bennet Kationen sind). Aus den Arbeiten von Pappas und Brandt (33) geht hervor, daß die Wirkungsweise solcher Induktoren in einer Veränderung der Spannungsverhältnisse an der Zellmembran besteht (s. Abb. 13 und 14). Daß von den anorganischen Salzen nur Kationen gute Induktoren sind, läßt sich durch die negative Ladung der Zellmembran, soweit ein neutrales oder basisches Milieu vorliegt, erklären (Dyar und Ordell, 51).

Wenn, wie wir annehmen, DNase durch Pinocytose aufgenommen wird, so müßte durch oberflächenaktive Substanzen ihr Eindringen erleichtert, d.h. ihre Wirkung erhöht werden. Dieses konnte durch unsere Versuche mit dem Anionen-Detergens Natrium-Tetra-Decyl-Sulfat gezeigt werden. Wurden Hefezellen mit 10^{-6} ml/ml dieser oberflächenaktiven Substanz inkubiert, so trat eine signifikante Steigerung des DNase-Effekts von 10 % gegenüber den Fermentkontrollen ohne Detergens auf.

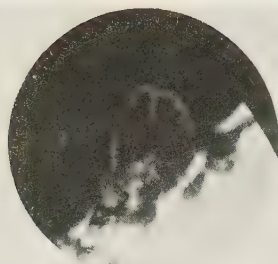


Fig. 3 Single pseudopodium with channel, enlarged from fig. 2 Magnification 100 times

Abb. 10 (Chapman-Andresen; Compt. -rendu Lab. Carlsberg 31, 77, 1958) Pseudopodium mit Kanälchen bei A. Chaos-Chaos 5 Minuten nach Inkubation mit M/4 MgCl.

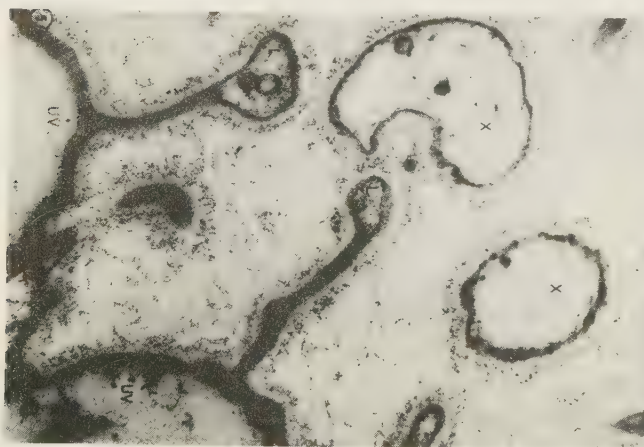


Abb. 11 (Pappas und Brandt; J. Biophys. Biochem. Cytol. 8, Nr. 3, 1960) Längs- und Querschnitte durch Pinocytose-Vakuolen, die mit Perritin besetzt sind.

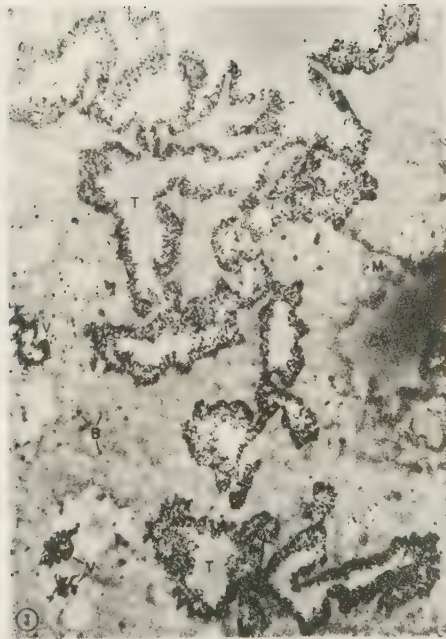


Abb. 12 (Pappas-Brand: J. Biophys. Biochem. Cytol. 8, Nr. 3, 1960) Pinocytoseschläuche (T), die mit Thoriumdioxid besetzt sind. Kontraktile Vakuole (CV).

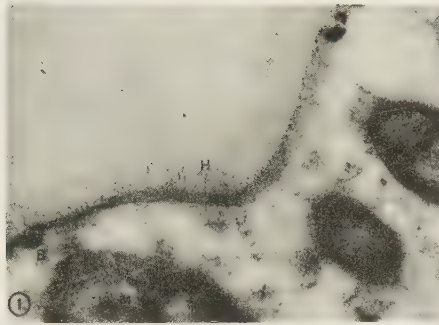


Abb. 13 (Pappas-Brandt: J. Biophys. Biochem. Cytol. 8, Nr. 3, 1960)
Haarförmige Fortsätze (H) bei Amöba Chaos-Chaos. Durchmesser
= 50 - 80 Å, Länge = 1000 - 2000 Å.

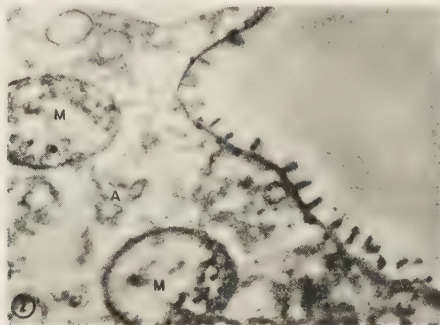


Abb. 14 (wie oben)
Amöba Chaos-Chaos mit RNase inkubiert. Die Fortsätze sind
dicker geworden, D = 300 - 450 Å.

Zusammenfassung

1. Desoxyribonuklease I (Worthington) in einer Konzentration von 5×10^{-6} g/ml dem Nährmedium zugesetzt bewirkt eine signifikante Steigerung der Mitoserate bei *Saccharomyces cerevisiae*.
2. Desoxyribonuklease I bewirkt in Konzentrationen von 5×10^{-6} g/ml dem Nährmedium zugesetzt eine signifikante Vergrößerung der Hefezellen.
3. Die oberflächenaktive Substanz Tween 80 zeigt in Konzentrationen von 10^{-5} bis 10^{-7} ml/ml dem Nährmedium zugesetzt keine sichere Wirkung auf mit Desoxyribonuklease inkubierte Hefezellen.
4. Das oberflächenaktive Kation Hexa-Decyl-Trimethyl-Ammonium-Bromid bewirkt in Konzentrationen von 10^{-8} und 10^{-9} ml/ml, wo es sonst keine Wirkung zeigt, eine hochsignifikante Hemmung der Desoxyribonuklease-Wirkung.
5. Das oberflächenaktive Anion Natrium-Tetra-Decyl-Sulfat bewirkt bei einer Konzentration von 10^{-6} und 10^{-8} ml/ml, wo es sonst hemmend wirkt, eine signifikante Steigerung des Desoxyribonuklease-Effekts.

Literaturverzeichnis
=====

1. V. Allfrey, A. F. Mirskey: J. Gen. Physiol. 36, 227, 1953
2. Bennet: Intern. Rev. Cytol. 8, 481, 1959
3. Bennet: Journ. Biophys. Biochem. Cytol. 2, Part 2, Suppl. S. 99
4. F. J. Bollum: Fed. Proc. 19, 305, 1960
5. S. Brody, B. Torell: Biochem. Biophys. Acta 25, 579, 1957
6. S. Brody: Nature 184, 13, 1959
7. C. Chapman-Andresen, H. Holter: Exp. Cell Res. 3, Suppl 52, 1955
8. C. Chapman-Andresen: Exp. Cell Res 12, 397, 1957
9. C. Chapman-Andresen: Compte rendu Lab. Carlsberg 30, 57, 1956
10. M. S. Chevremont: Sompte rendu Sèances Soc. Biol. 151, 1621, 1957
11. G. N. Cohen, H. V. Rickenberg: Ann. Inst. Pasteur 91, 693, 1956
- 11 b A. Fischer: Vorlesungen über Bakterien. Fischer Jena 1903
- 12 H. Friedrich-Freksa, G. Zaki: Entsch. f. Naturforschung
9b, 394, 1954
13. R. J. Goldacre, B. Sylven: Nature 184, 63 1959
- 13 a. E. Heinz: 12. Colloq. Gesellsch. f. Physiol. Chemie 1961
Springer Verl. Berlin, Göttingen, Heidelberg
- 13 b. Hill, K. B. Hensch: Virology 183, 1818, 1959
14. H. Holter, Holtzer, Exp. Cell Res. 18, 421. 1959
15. H. Holter: Intern. Rev. Cytol. 8, 481, 1959
16. G. Knaysi: Elem. Bact. Cytol. 2nd. Ed. Comstock, Corn. Univ.
Press, New York 1951
17. A. Kornberg: Harvey Lectures, Ser. 53, 83, 1959
18. O. D. Kowlessar, K. J. Altmann: Arch. Biochem. 54, 355, 1955
19. R. E. Kunkee, A. B. Pardee: Biochem. Biophys. Acta 19, 236, 1956
20. I. R. Lehmann: Ann. N. Y. Acad. Sci. 81, 776, 1959
21. H. Lettrè, H. I. Thom: Naturw. 41, 144, 1954
22. W. A. Lewis: Bul. J. Hopkis Hosp. 49, 17, 1931
23. H. Malmgreen, B. Sylven: Cancer Res. 19, 525, 1959
24. Mast, Doyle: Protoplama 20, 550, 1934
- 25- N. D. McElroy, C. Glass: The chem. Basis of Heridity,
Baltimore 1957
26. P. Mitchell: Ann. Rev. Microbiol. 13, 407, 1959

27. P. Mitchell; J. Gen. Microbiol. 11, 1954
28. P. Mitchell; Symp. Soc. Exp. Biol. Nr. 8, 254, 1954
29. P. Mitchell, J. Moyle; Discussions, Faraday Soc. 21, 258, 1956
30. Murray, Robinow; Exp. Cell Res. 4, 390, 1953
31. E. O. Morris; in Cook "Chemistry and Biology of Yeasts"
Acad. Press Inc. New York 1958
32. H. G. Ochs; Wirkungen einer DNase I und des Oestradiol-17-
beta auf die Vermerkungsrate von *Saccharomyces*
cerevisiae. Inauguraldiess. der medizin. Fakultät
der Univ. Frankfurt (Main), 1961
33. G. D. Pappas, P. W. Brand; J. Biophys. Biochem. Cytol.
Vol. 8, Nr. 3, 1960
34. K. E. Paschkis; Cancer Res. 18, 981, 1958
35. M. Privat de Garilhe, M. Laskowski; J. Biol. Chem. 215, 269, 19
36. T. Rosenberg, W. Wilbrandt; Exp. Cell Res. 9, 49, 1955
37. M. R. I. Salton; Surface Layers of Bact. Cells in "The Bacteria"
Vol. 1, Acad. Presse New York 1960
38. Schumaker; Exp. Cell Res. 15, 314, 1958
39. C. Shinohara, K. Fukushi, J. Suzuki; J. Bact. 74, 413, 1957
40. G. Tuschy; Wirkungen nativer, denaturierter und hydroly-
sierter DNase I auf die Vermehrung von Bäcker-
hefe. Inaug. diss. der medizin. Fakultät der
Univ. Frankfurt (Main), 1962
41. J. D. Watson, F. H. C. Crick; Nature 171, 737, 1953
42. Weibull; Acta Chem. Scand. 11, 881, 1957
43. R. K. Zahn, A. Docter, B. Heicke, H. Kuhlemann, G. Ochs et al
Nature 182, 1679, 1958
44. R. K. Zahn, H. und S. Müller, G. Zahn; Biochem. Ztschr.
331, 518, 1959
45. R. K. Zahn; K. Rajewski, G. und R. Kiefer, L. Eitel, G. Zahn;
Naturwiss. 46, 518, 1959
46. R. K. Zahn, G. und R. Kiefer, G. Zahn; Biochem. Ztschr.
334, 49, 1960
47. R. K. Zahn, G. Kiefer; Exp. Cell Res. 19, 460, 1960

48. R.K. Zahn; Nature 184, 1324, 1959
49. R.K. Zahn; Biochem. J. 76, 66, 1960
50. R.K. Zahn; G. Tuschy; Nicht veröffentlicht
51. Monographie: Strategie of Chemotherapie. 8 th Symp. Soc. Gen. Microbiol., Roy. Inst. London, Cambridge.
Univ. Press 1958

Lebenslauf

Ich wurde am 30. November 1934 als Tochter des Versicherungskaufmanns Hans Mey und seiner Ehefrau Charlotte geb. Meyer in Kassel geboren.

Von Herbst 1941 bis Ostern 1946 besuchte ich die Volksschule in Kassel, Grebenstein und Netze/Waldeck, danach das Realgymnasium für Jungen in Bad Wildungen bis 1950 und nach Übersiedlung meiner Familie nach Kassel dort die Heinrich-Schütz-Schule, wo ich 1954 die Reifeprüfung ablegte.

1954 bis 1955 hielt ich mich in Neuchâtel (Schweiz) auf, um Französisch zu lernen.

Im Wintersemester 1955 begann ich mein Studium an der Frankfurter Naturwissenschaftlichen Fakultät. Nach drei Semestern sattelte ich um und studierte nun Medizin. Die ärztliche Vorprüfung bestand ich im März 1959. Danach belegte ich zwei Semester in Zürich und legte im Sommersemester 1962 das Staatsexamen an der Frankfurter Universität ab.

